

## Methods of increasing platelet and hematopoietic stem cell production

**Publication number:** CN1723036 (A)

**Publication date:** 2006-01-18

**Inventor(s):** KAUSHANSKY KENNETH MACDONALD B [US] †

**Applicant(s):** DIMENSIONAL PHARM INC [US] †

**Classification:**


- international: **A61K38/18; A61K38/18**

- European:

**Application number:** CN20038025033 20030918

**Priority number(s):** US20020411779P 20020918

**Also published as:**

 ZA200503036 (A)

Abstract not available for **CN 1723036 (A)**

.....  
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A61K 38/18 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03825033.0

[43] 公开日 2006年1月18日

[11] 公开号 CN 1723036A

[22] 申请日 2003.9.18 [21] 申请号 03825033.0

[30] 优先权

[32] 2002.9.18 [33] US [31] 60/411,779

[32] 2002.9.18 [33] US [31] 60/411,700

[86] 国际申请 PCT/US2003/029701 2003.9.18

[87] 国际公布 WO2004/026332 英 2004.4.1

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.10

[71] 申请人 奥索-麦克尼尔药品公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 K·考尚斯基 B·R·麦唐纳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 刘玥

权利要求书2页 说明书18页 附图2页

[54] 发明名称

增加血小板和造血干细胞产生的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种增加造血干细胞产生的方法。该方法包括将TPO模拟化合物施用于受试者。本发明也公开了包含TPO模拟化合物和药用载体的药物组合物。

1. 一种增加受试者中造血干细胞产生的方法，包括将 TPO 模拟化合物施用于所述受试者的步骤。
2. 一种向受试者提供造血干细胞的方法，包括步骤：
  - 5 将 TPO 模拟化合物施用于受试者以增强骨髓中干细胞群的扩展和/或使外周循环中的干细胞流动；
  - 收集一种或多种骨髓干细胞或外周循环中的干细胞；以及
  - 将收集的干细胞植入受试者。
3. 根据权利要求 1 和 2 的方法，其中所述的受试者为人。
- 10 4. 根据权利要求 2 的方法，其中在收集后将所述的一种或多种干细胞冷冻保藏。
  5. 根据权利要求 4 的方法，其中在将一种或多种冷冻保藏的干细胞植入受试者之前将其解冻并测定为存活的。
  6. 根据权利要求 4 的方法，其中将一种或多种干细胞植入需要
  - 15 此种移植的受试者中。
  7. 根据权利要求 1 和 2 的方法，其中 TPO 模拟化合物相对于一种或多种 rhTPO 和 rhIL-11 具有降低的免疫原性。
  8. 根据权利要求 1 和 2 的方法，其中 TPO 模拟化合物相对于一种或多种 rhTPO 和 rhIL-11 具有改进的 PK 分布。
  - 20 9. 一种减少在受试者体内再灌输干细胞后的植入时间的方法，包括下列步骤：
    - 将 TPO 模拟化合物施用于受试者；
    - 增强骨髓中干细胞群的扩展和/或使外周循环中的干细胞流动；
    - 和
    - 25 收集一种或多种骨髓干细胞或一种或多种外周循环中的干细胞；
    - 和
    - 将所收集的一种或多种干细胞植入受试者。
  10. 一种减少迟发型初级移入发病率的方法，包括下列步骤：
    - 将 TPO 模拟化合物施用于受试者；
    - 30 增强骨髓中干细胞群的扩展和/或使外周循环中的干细胞流动；
    - 和
    - 收集一种或多种骨髓干细胞或一种或多种外周循环中的干细胞；

和

将收集的一种或多种干细胞植入受试者。

11. 一种减少血小板生产中的次级衰竭发病率的方法，包括下列步骤：

5 将 TPO 模拟化合物施用于受试者；

增强骨髓中干细胞群的扩展和/或使外周循环中的干细胞流动；

和

收集一种或多种骨髓干细胞或一种或多种外周循环中的干细胞；

和

10 将收集的一种或多种干细胞植入受试者。

12. 一种减少在受试者体内再输注干细胞后血小板和/或中性粒细胞的植入时间的方法，包括下列步骤：

将 TPO 模拟化合物施用于受试者；

增强骨髓中干细胞群的扩展和/或使外周循环中的干细胞流动；

15 和

收集一种或多种骨髓干细胞或一种或多种外周循环中的干细胞；

和

将收集的一种或多种干细胞植入受试者。

## 增加血小板和造血干细胞产生的方法

本申请要求 2002 年 9 月 18 日申请的 No. 60/411, 779 和 60/411,  
5 700 的优先权。

## 发明背景

血小板生成素 (TPO), 最初被克隆作为血小板产生的主要调节因子, 其在造血干细胞 (HSC) 生物学中具有关键性的作用。Kaushansky 等, Nature, 369: 568-571 (1994)。事实上, 所有具有种群恢复活性的原始 HSC 都表达 c-Mpl-TPO 的受体。Solar 等, Blood, 92: 4-10  
10 (1998)。TPO 单独或与其它早期作用的细胞因子, 诸如干细胞因子 (SCF)、白介素 3 (IL-3) 或 Flt-3 配体结合增强初始 HSC 的体外增殖。Ku 等, Blood, 87: 4544-4551 (1996); Sitnicka 等, Blood, 87: 4998-5005 (1996)。体内试验证实了这些结论。Kimura 等, Proc. Natl.  
15 Acad. Sci. U. S. A., 95: 1195-1200 (1998)。c-Mpl 基因突变引起的先天性无巨核细胞血小板减少的临床观察也支持了干细胞中 TPO 自我更新和扩展的重要性, 其中先天性无巨核细胞血小板减少是一种儿童期的全造血系统衰竭病。Ballmaier 等, Blood, 97: 139-146 (2001)。人们已发现成熟骨髓中 HSCs 的扩展比骨髓移植后 tpo-/-小鼠中少 10  
20 至 20 倍。外源地添加 TPO 弥补了这种缺陷。Fox 等, J. Clin. Invest., 110: 389-394 (2002)。这些报道表明 TPO 是 HSCs 的自我更新和扩展的主要的非多余的供应因子。

自体干细胞移植 (ASCT) 被日益广泛地用作可能有效的、骨髓清除性化疗、高剂量化疗给药后的骨髓重建的手段。这些方法的原理是  
25 使 HSCs 由骨髓流动到周围血液中 (利用 G-CSF+/-启动的化学疗法), 其中周围血液通过脱落收集。这些干细胞, 形成了所收集的种群的一小部分, 然后当骨髓清除性化疗后再灌注时能够重新构成骨髓。在此方法中获自周围血液的干细胞好像类似于脐带血细胞并且其在骨髓清除性化疗后再生骨髓的能力优于骨髓细胞的能力, 其植入中性粒细胞  
30 和血小板的时间小于 10 天。ASCT 最普遍适用的肿瘤类型为骨髓瘤、淋巴瘤 (何杰金氏病和非-霍奇金淋巴瘤) 以及急性骨髓性白血病。

用 ASCT 进行的高剂量化学疗法可逐渐地被用作首行疗法, 尤其

是用于骨髓瘤中，但是其同时也被用作首行化疗失败后的抢救治疗。这样的受试者常常已被进行严重地预处理，因此具有受损伤的造血潜能的骨髓。

5 这些收集的细胞被再输注到受试者中后，受试者例如人患者有一个时期处于感染（低嗜中性粒细胞）和出血（低血小板）的危险之中。这个时期基于再灌注干细胞的数量而变化，其反过来依赖该能力来刺激骨髓中干细胞的扩展。此外，一些受试者在植入的起始阶段后也出现骨髓衰竭。

10 当周围血液干细胞被流动化并由 HLA 匹配的供体收集时，干细胞移植也用于异源的情形。由于移植物抗宿主疾病的发生，与 ASCT 相比，此种异源移植不太经常使用，但是当不能够从患者获得充分的干细胞时可使用异源移植。然而在骨髓细胞完全缺乏的情况下，使用异源干细胞来获得部分的植入（“迷你移植”）可由于移植物对肿瘤的作用而提供一些治疗益处。

15 目前在极端少量的患者中的另一种可能用途是用于基因治疗领域，其中用缺陷基因的正常拷贝转导的正常异源的骨髓细胞或自体同源细胞可有效地用于某些由单基因缺陷引起的遗传病。异源移植也被研究作为自身免疫疾病的一种治疗选择。

20 尽管 ASCT 具有潜在的用途并且是简单的，但对其广泛应用的显著限制超出了所期待的全血细胞减少的时间，因此受试者的强力支持是允许再灌注细胞来恢复足以维持周围血液数的血细胞生成的水平所必需的。显著比例的移植受试者（最高达 40%）需要在移植后有延长的血小板灌输（植入的原发性失败）。较少的组（在自体同源移植中为 5-10%，但是对于异源移植 >20%）发展了次级血小板减少，尽管有  
25 初始的植入，有时需要延长的灌输。植入失败或迟发性的植入失败与增加的死亡率、增加的保健费用和降低的受试者生活质量相关联。

因此在这样的受试者中需要增加 HSC 的产生。研究证明了给患者施用 TPO 导致周围血液祖细胞的流动化。一项研究证明在多剂量组合施用 TPO 与 G-CSF 后，来自多重谱系的集落形成细胞和 CD34+ 细胞流  
30 动到周围血液中。另一项研究表明在患有另外的正常血细胞生成的癌症患者中施用单一剂量的 TPO 3-7 天之后，循环 CD34+ 细胞出现 6 倍的增加。在这些研究中，干细胞富集的亚级分（CD34+Thy+Lin -）几

乎增加了 9 倍并且相应的巨核细胞亚级分 (CD34+CD41+CD14<sup>-</sup>) 几乎增加了 15 倍。这些研究表明 TPO 能够使来自骨髓的自我更新的 HSC 和相应的子代细胞流动。尽管重组 TPO (rhTPO) 的利用具有增加 HSC 产生的希望, 但人们需要通过给药方式来改善 TPO 疗法。

5 因此人们需要基本上保持 TPO 的全部激动剂活性并且同时允许以不同的方式施用小分子 TPO 模拟化合物。

也存在对相对于一种或多种 rhTPO 和 rhIL 具有降低的免疫原性以及相对于一种或多种 rhTPO 和 rhIL-11 具有增加的药物代谢动力学分布的小分子 TPO 模拟化合物的需求。

#### 10 发明概述

本发明的目的是提供一种增加受试者的 HSC 产生的方法, 包括将 TPO 模拟化合物施用于该受试者的步骤。

15 TPO 模拟化合物可单独地或在药用载体中给药于受试者。TPO 模拟化合物可单独施用或与一种或多种其它的模拟化合物和/或其它可增强干细胞由骨髓中流动的试剂结合施用, 包括例如 G-CSF、SCF、IL-3 和/或 Flt-3。

20 因此, 本发明的另一个目的是提供含有有效量的 TPO 模拟化合物和药用载体的 TPO 模拟物的药物组合物。当施用 TPO 模拟化合物时, 有效量的 TPO 模拟化合物增强受试者骨髓内干细胞群体的扩展和/或增强干细胞流动到受试者的外周循环中。

25 本发明的目的也在于给受试者提供 HSCs 的方法。该方法可包括将 TPO 模拟化合物施用于受试者以增强骨髓内干细胞群体的扩展和/或使干细胞流动到外周循环中的步骤。其次, 该方法可包括由受试者的骨髓或者外周循环收集一种或多种干细胞, 然后将收集的一种或多种干细胞植入受试者。

本发明的目的也在于由供体受试者给受体受试者提供 HSCs 的方法。

#### 附图的简要说明

图 1 为化合物的列表, 其可适用于本发明的方法中。

30 图 2 为表示根据本发明的方法调控血小板和 HSC 产生的示意图。

#### 发明详述

在这里引用的专利公开和文献的有关部分被引入作为参考。

在一个实施方案中，本发明的目的是通过将 TPO 肽、TPO 模拟化合物给药于受试者而增加 HSC 的产生，所述的 TPO 模拟化合物包括但不限于在图 1 中列举的化合物以及图 1 所列举化合物的 PEG 化的形式。用于将图 1 中所示的化合物 PEG 化的方法描述在美国专利 No. 5, 869, 451 中。

在一个实施方案中，本发明的目的是通过将 TPO 肽给药于受试者而增加 HSC 的产生，如相应的美国申请号-----（代理人案号 038073-5005 PR），于 2003 年 8 月 28 日申请的，其全部内容在此处引作参考。

根据此实施方案，TPO 肽为一种化合物，其具有（1）小于约 5000 道尔顿的分子量，以及（2）用  $IC_{50}$  表示的与 TPO 受体结合亲和力不多于约  $100 \mu M$ ，其中肽的从零到所有的 -C(O)NE-键已被选自由下述键组成的组的键取代：-CH<sub>2</sub>OC(O)NR-键；磷酸酯键；-CH<sub>2</sub>S(O)<sub>2</sub>NR-键；CH<sub>2</sub>NR-键；C(O)NR<sub>6</sub> 键；以及 -NHC(O)NH-键，其中 R 为氢或低级烷基并且 R<sub>6</sub> 为低级烷基，此外其中所述化合物的 N-末端选自由下述基团组成的组：-NRR<sub>1</sub> 基团；-NRC(O)OR 基团；-NRS(O)<sub>2</sub>R 基团；NHC(O)NHR 基团；琥珀酰亚胺基团；苄氧基羰基-NH 基团；和在苯环上具有 1 到 3 个选自低级烷基、低级烷氧基、氯和溴的取代基的苄氧基羰基-NH 基团，其中 R 和 R<sub>1</sub> 独立地选自氢和低级烷基，并且更进一步地，当化合物的 C-末端具有通式 -C(O)R 时，其中 R<sub>2</sub> 选自羟基、低级烷氧基和 -NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>，其中 R<sub>3</sub> 和 R<sub>4</sub> 独立地选自氢和低级烷基，并且其中 -NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> 基团的氮原子可任选地为肽的 N-末端的氨基以形成环肽及其生理学上可接受的盐。

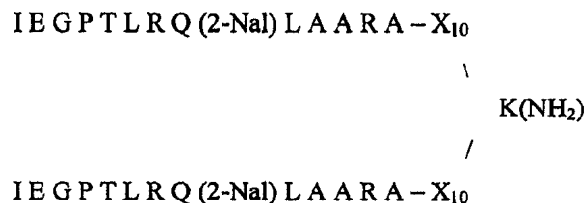
在一个相关的实施方案中，TPO 模拟物肽含有氨基酸序列 X<sub>9</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>，其中 X<sub>9</sub> 为 A, C, E, G, I, L, M, P, R, Q, S, T 或 V；且 X<sub>8</sub> 为 A, C, D, E, K, L, Q, R, S, T 或 V；和 X<sub>6</sub> 为 β-(2-萘基)丙氨酸（在这里被称为“2-Nal”）残基。更优选地，X<sub>9</sub> 为 A 或 I，以及 X<sub>8</sub> 为 D, E 或 K。此外，X<sub>1</sub> 为 C, L, M, P, Q 或 V；X<sub>2</sub> 为 F, K, L, N, Q, R, S, T 或 V；X<sub>3</sub> 为 C, F, I, L, M, R, S, V 或 W；X<sub>4</sub> 为 20 个遗传编码的 L-氨基酸中的任何一个；X<sub>5</sub> 为 A, D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V 或 Y；以及 X<sub>7</sub> 为 C, G, I, K, L, M, N, R 或 V。

尤其优选的 TPO 模拟物肽为 I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R A。

在另一个实施方案中，TPO 模拟物肽被二聚化或寡聚化以增加化



化合物的亲合力和/或活性。此种化合物的实例包括：



其中  $X_{10}$  为肌氨酸或  $\beta$ -丙氨酸残基或这些化合物的 PEG 化的形式。

5 PEG 化的形式可包括一个与各个 N-末端异亮氨酸共价连接的 20k MPEG 的残基。

一种或多种 TPO 模拟物肽，并且尤其是 PEG 化的 TPO 模拟肽（在这里被通称为“TPO 模拟化合物”或“本发明的 TPO 模拟化合物”），可用于增加骨髓中干细胞的数量。Somlo 等人[Blood, 93(9): 2798-10 2806 (1999)]进行的研究提供了支持 TPO 模拟化合物在 ASCT 中的用途的重要数据，其中重组的人血小板生成素（rhTPO）能增强对减少脱落数量的 G-CSF 应答的 CD34+干细胞的流动和脱落产量。随后，再灌注细胞的植入也增加了减少至 ANC  $> 0.5 \times 10^9 / L$  的时间和血小板输血的独立性，尽管这些作用在此探索性研究的小试样量中没有达到15 统计学上的显著性。通过增加干细胞的数量，显著地增加了由受试者收集的总干细胞。此外，通过增加由受试者收集的干细胞的数量，有效地移植回受试者的干细胞的量也显著地增加，由此潜在地减少了植入的时间（受试者具有不充足的嗜中性粒细胞和血小板所持续的时间），从而预防了并发症。

20 此外，本发明还可以减少不能收集足够的细胞继续以进行他们的初级疾病治疗例如化学疗法及其它骨髓离格治疗的受试者的比例。此外，具有迟发型初级植入的受试者数量的比例也减少了。

TPO 模拟化合物，诸如在图 1 中显示的那些以及在这里公开的，可用于增加 HSC 的产生。这些同时伴随给受试者施用一种或多种化合物。25 图 1 中所示的以及在这里公开的化合物，以及图 1 中所示化合物的 PEG 化的形式，可具有相对于一种或多种 rhTPO 和 rhIL-11 减少的免疫原性，并且还可以具有相对于一种或多种 rhTPO 和 rhIL-11 增加的药物代谢动力学分布。

TPO 模拟化合物还可以用于向受试者提供自体同源的 HSCs。典型地，这些涉及下列步骤：将 TPO 模拟化合物施用于需要施用的受试者以增强骨髓中干细胞群的扩展和/或外周循环中干细胞的流动；收集一种或多种骨髓干细胞或一种或多种外周循环中的干细胞；以及将收集的一种或多种干细胞移植回受试者。

此外，按照本发明上面描述的方法收集所获得的干细胞可利用本领域已知的干细胞低温贮藏的方法进行冷冻保藏。因此，利用低温贮藏，可保持干细胞使得一旦需要干细胞移植的受试者需要使用时，干细胞可以被解冻并且移植回受试者。

TPO 模拟化合物，包括图 1 所示和在这里公开的化合物以及图 1 所示化合物的 PEG 化的形式，可因此被用于，尤其是用于：减少受试者干细胞再输注后的植入时间；减少迟发型初级植入的发生；减少血小板产生的继发性衰竭的发生；以及在受试者进行干细胞再输注后减少血小板和/或嗜中性粒细胞植入的时间。这些方法典型地包括下列步骤：将 TPO 模拟化合物施用于需要施用的受试者以增强骨髓中干细胞群的扩展和/或外周循环中干细胞的流动，然后收集一种或多种骨髓干细胞或一种或多种外周循环中的干细胞，然后在通过受试者的特定需要而确定的合适的时间内将收集的一种或多种干细胞移植回受试者。

本发明的方法也可用于增加供体受试者的干细胞数量，供体受试者的细胞然后被用来救援进行接受了骨髓烧蚀化疗的受体受试者。

#### A. 剂型和给药途径

用于本发明的 TPO 模拟化合物可作为含有作为活性成分的至少图 1 所示和/或在这里公开的和/或在美国专利 No. 5, 869, 451 描述的一种肽或肽模拟物与药物载体或稀释剂的药物组合物而被施用，美国专利 No. 5, 869, 451 的全部内容其中在此处引作参考。化合物可通过口服、肺、非肠道的（肌内的、腹腔内、静脉内（IV）或皮下注射）、吸入（通过细粉制剂）、透皮、鼻、阴道、直肠或舌下的给药途径进行施用并且可被配制成为适于每种给药途径的剂型。参见，例如，Bernstein 等，PCT 专利公开 No. W093/25221；Pitt，等，PCT 专利公开 No. W0 94/17784；以及 Pitt，等，欧洲专利申请 613, 683，引

入每一文献作为参考。

用于口服的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和粒剂。在这样的固体剂型中，活性化合物可与至少一种惰性的药用载体诸如蔗糖、乳糖或淀粉混合。这样的剂型还可以包括除了惰性稀释剂之外的其它物质，例如，润滑剂诸如硬脂酸镁。在为胶囊、片剂和丸剂时，剂型也可包括缓冲剂。片剂和丸剂还可被制备成具有肠溶衣。

用于口服的液体剂型包括可药用的含有本领域通常使用的惰性稀释剂诸如水的乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除此类惰性稀释剂之外，组合物还可以包括助剂，诸如润湿剂、乳化剂和悬浮剂，以及糖、调味剂和芳香剂。

非肠道施用的制剂包括无菌水或非水溶液、悬浮液或乳剂。无水溶剂或赋形剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油，诸如橄榄油和玉米油，凝胶，以及可注射的有机酯诸如油酸乙酯。这样的剂型也可含有助剂，诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

可通过，例如，通过细菌过滤器过滤，通过将杀菌剂混入组合物，通过辐射组合物，或通过加热组合物进行杀菌。还可以在使用前利用无菌水，或其它的无菌注射用培养基即刻配制它们。

用于直肠或阴道施用的组合物优选地为栓剂，其除活性物质之外可含有赋形剂，诸如可可脂或栓剂蜡。用于鼻或舌下施用的组合物也利用本领域公知的标准赋形剂进行配制。

本发明的组合物还可以以微囊密封，通过例如，Tice 和 Bibi 所述的方法 ( Treatise on Controlled Drug Delivery , ed. A. Kydonieus, Marcel Dekker, New York (1992), pp. 315-339 ) 密封。

组合物还可以与尤其是 G-CSF、SCF、IL-3 或 Flt-3 和/或其它可增强骨髓干细胞流动作用的因子组合 ( 包括致敏化疗和整联蛋白拮抗剂 )。

## B. 剂量

本发明所需的 TPO 模拟化合物的量取决于许多不同的因素，包括施用的方式、靶点、受试者的生理状态及施用的其它药物。因此，治疗剂量应被滴定到使安全性和效力最优化。典型地，在活体外使用的剂量可在这些试剂原位施用的量中提供有用的指导。用于治疗特定紊乱

的有效剂量的动物试验将进一步提供人剂量的预示性的指标。不同的设想描述在, 例如, Gilman 等 (eds), Goodman 和 Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第 8 版, Pergamon 出版社 (1990); 以及 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 7 版, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1985); 每一文献在此引入作为参考。

当以约 0.001 mg 到约 20 mg / kg 体重/每天的剂量范围施用时, TPO 模拟化合物对本发明是有用的。任选地, 在一些情况下, 也可施用 0.0001mg / kg 到约 10 mg/kg。可通过所治疗的特定病症、给药途径以及通过临床医生基于诸如病症的严重性、受试者的年龄和基本状况等进行的判断对施用的特定剂量进行调节。

### C. 受试者和指标

如在这里所使用的, 受试者包括作为在恶性病治疗过程中进行自体同源干细胞或骨髓移植的候选人或作为基因治疗组分的任何人。其它可能的候选者为捐献干细胞或骨髓于受试者用于恶性疾病或基因治疗的同种移植的受试者。

为了提供植入的可接受的概率, 必须收集最小量的干细胞。尽管未精确地定义, 但是普遍接受的是必须收集  $2-3 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>细胞/公斤来提供合理的植入机会。看起来好像  $5 \times 10^6$  /kg 细胞的再输注产生了最佳的植入时间。需要大量的这些细胞, 因为能够长期重建骨髓的 CD34<sup>+</sup>细胞特定亚型的实际数目是非常小的。多达 20%的移植患者被认为是差的流动体, 其需要多重的脱落来产生足够的细胞。尽管差的干细胞流动作用的一种最重要预示是患者的年龄, 然而用化疗进行的强烈预处理也是一种重要的因素。可能有许多的患者, 尤其是上了年纪的患有骨髓瘤或 NHL 的患者, 其因为成功植入的概率低而不被考虑采用 ASCT。

因此, 本发明的方法提供了一种对未满足 ASCT 需要的解决方案, 即需要增加成功和快速植入的患者的比例。这些主要地取决于通过增加流动细胞的数目或通过增加流动 CD34<sup>+</sup>群体中 HSCs 的比例来改善干细胞的流动作用得以实现。因此本发明的方法具有下列的益处:

1. 允许因具有不能接受的失败植入的高风险而不被认为是候选者的患者进行移植;
2. 减少了产生最小可接受收集所需脱落的数量;
3. 通过增加可用于移植的 HSCs 的数量而减少植入的初级和继发性衰竭的发生; 和
4. 通过增加重要的造血系统的定向前体的数量而减少了初级植入所需的时间。

根据 TPO 对 HSCs 的作用, 本发明的 TPO 模拟化合物也在干细胞移植中具有下列临床益处:

● 增加脱落的产生: 大量的研究表明再灌注 CD34<sup>+</sup>干细胞的数量是确定植入时间的一个重要因素。如用 TPO 证明的, 添加 TPO 模拟化合物可增加作为 G-CSF 和化疗的常规流动作用方式的附属物的 CD34<sup>+</sup>细胞的流动作用。主要的优点是增加快速植入以及后来长期植入的前景。

减少产生可接受数量的细胞所需脱落的数量将降低费用和患者的不便。增加脱落产量对于具有低流动作用的危险因素的患者(老年和强烈的预处理)是尤其有用的。这样的患者可能不是进行 ASCT 的候选者。

● 增加了脱落细胞植入的可能性:

骨髓清除性化疗后的长期植入是通过小部分的 CD34<sup>+</sup>细胞群体产生的(大多数在 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>群体内)。因为它们如此稀少, 需要大量的 CD34<sup>+</sup>细胞来提供有效的植入( $2-5 \times 10^6/\text{kg}$ )。G-CSF 不影响不同 CD34<sup>+</sup>细胞亚型的比例并且被简单地用作可在收集之前增加这些细胞在周围血液中的数量的试剂。致敏化疗事实上可能对这样的细胞是有毒的。然而 TPO 日益广泛地被接受作为可增加大多数原始干细胞的自我更新并且因此能够长期造血再生的试剂。因此 TPO 模拟化合物的类似作用可增加可能有助于长期植入 CD34<sup>+</sup>细胞群体的比例并且因此减少植入的失败风险。TPO 也可增加定向于巨核细胞系统的干细胞的数目, 因此产生较早的血小板输血独立性, 即减少植入的时间。

上面描述的两个有益的作用可以是加和性的或协同性的，导致比用仅仅增加干细胞流动作用的试剂产生更大程度的植入时间的减少。

本发明的 TPO 模拟化合物的应用将可能仅仅要求<sup>5</sup>在脱落之前，给予很小数量的剂量，例如，通过静脉内或皮下方式给予。这样的剂量药方将使显著抗原原性的危险减小到最小，已经预测由于 PEG 化产物的应用所述抗原原性是很低的。

本发明的 TPO 模拟化合物首先被给药于正常的志愿者：

1. 来建立 TPO 模拟化合物对外围血液 CD34<sup>+</sup>细胞群体、血小板计数及其它血液学参数的作用；
- 10 2. 依据限制毒性的剂量和高频率的不利事件来建立 TPO 模拟化合物的初步安全分布图；
3. 来确定 TPO 模拟化合物的最合适的剂量、剂量方式和预-脱落剂量的服药时间；以及
4. 来确定 TPO 模拟化合物在人体内的药物代谢动力学分布。
- 15 5. 来产生有关本发明的 TPO 模拟化合物作用的初步比较信息以及有关周围血液干细胞的多血统潜能的 G-CSF。

正常的人志愿者，是用于评价药物代谢动力学以及初始安全分布的最合适的群体，这些志愿者因为缺少化疗和疾病的背景效果而提供<sup>20</sup>了 TPO 模拟化合物对 HSCs 影响的最清楚了解。

研究是单一盲目的，其中正常人志愿者接受本发明 TPO 模拟化合物的单一静脉内剂量的剂量增加的研究，以一个小时的输注方式来提供。起始剂量为 15ug / kg。连续的剂量群体将接受 25、50、100 和 200 ug / kg。每个群体中登记了四个受试者，其中的三个将接受活<sup>25</sup>性治疗，一个将接受安慰剂。在输注过程中以规则的（15 分钟）间隔观察各个受试者并且象住院病人那样保持 24 小时闭路安全监控和药物代谢动力学采样。此外，在第 2、4、7、14、21 和 28 天追踪出院病人的安全、药物代谢动力学和药效。在进行上述的分组后将各个连续的剂量群体治疗两周的时间

30 当在 2/3 的积极治疗的受试者中观察到显示药效作用（解释为相对于预处理的值血小板数增加 50%）的剂量时，将该水平的剂量扩展至包括另外的四个受试者（3 / 1 的活性/安慰剂）。如果效力被证实，

将编制另外一个由六个受试者组成的剂量群体（4 / 2 的活性/安慰剂）来提供进一步的药效作用的证明。如果药效作用仅仅在最高的设计剂量处被观察到，则考虑进一步增加剂量，假如没有观察到毒性的话。

5 如果也许或可能与研究的药物治疗相关的安全/耐受作用在任意剂量的单个活性治疗的受试者中发生，则在该剂量下编制四个另外的受试者（3/1 的活性的/安慰剂）以确定是否限制毒性的剂量已被鉴定。

10 在输注开始后 30 分钟、在输注结束时以及在输注结束后的下述时间取血样进行药物水平的测定：5 分钟、15 分钟、30 分钟、1、2、4、8、12、24、48、96 小时和 7 以及 14、21 和 28 天。利用基于细胞的生物学测定或者通过 ELISA 测定化合物水平。

为了进行比较，将单一剂量的 G-CSF 给药于三个受试者来测定对 CD34+细胞的作用。

TPO 模拟化合物对外围的血液 CD34+计数量的作用，是否任意的将会被延迟几天（3-7 天，如果该作用类似于血小板生成素）。

15 此外，因为 TPO 模拟化合物的药物代谢动力学对 PD 分布的未知影响，不能确定将在何时观察到单一剂量的最大作用。最大作用的记时将确定在随后的患者研究中 TPO 模拟化合物计量和 CD34+细胞收集之间的间隔。周围血液 CD34+数量和随后收集的产量之间的良好相关性已被证明表明了此种方法是适当的。确保 TPO 模拟化合物发明是在 G-CSF 之前给予的，从而能够使本发明的骨髓内的 HSC 群体扩展以及  
20 随后使扩展的群体流动化。大多数利用 G-CSF 来刺激流动化的研究产生具有从所述的收集到给药时期结束时共五天时间的药物。TPO 模拟化合物的药效分布可能要求其在 G-CSF 之前的某些天给药。

25 TPO 模拟化合物对流动化的群体中正在自我重新新的 HSCs 的数量的影响可提供自我更新能力的增加，其可导致使用较少量的流动化的细胞进行的成功植入、更易于进行串联移植以及 TPO 模拟化合物可最终替换 G-CSF 或为标准的流动化剂。

30 可通过下述步骤寻找 TPO 模拟化合物的临床药理学方面：通过测定正常志愿者的 CD34+群体的自我更新能力，持续长期的群体形成能力的体外试验研究（LTC-IC 培养物）以及通过进行 SCID / NOD 小鼠再生分析，其中流动化的细胞被灌筑到致死辐射的 SCID/NOD 小鼠中。初步计算表明，用包含在 30 - 50 ml 的血液中的 CD34+细胞进行这样

的研究应该是可行的，条件是  $CD34^+$ 计数已经上升到大约  $15 \times 10^3 / ml$ 。

支持这些描述的假设如下：

- 5 1. 通过 Ficoll/Hypaque 分离，然后通过阴性筛选除去  $Lin^+$ 细胞而由正常的受试者获得 PBMCs。

通过 FACS 分离这些富集群体的  $CD34^+ CD38^-$ 亚级分并给药于 SCID / NOD 小鼠。小鼠也接受辅助细胞和生长因子来允许每一小鼠中使用较少数目的  $CD34^+CD38^- Lin^-$ 细胞 (Bonnet 等, Bone, Marrow Transplantation, 23: 203-209 (1999))。任选地，使用没有进一步地纯化的原始 PBMC 群体来提供重新群居的细胞和辅助细胞。

- 15 2. 此分析的初级终点为受体小鼠的存活力。然而也进行 Southern 印迹分析来检测受体小鼠中的人 DNA。如有可能，通过人源选择性的长期髓培养物和 / 或利用人特定的 MAbs 进行的流式细胞计数法来检测人的祖细胞。

- 20 3. 各个受试者将提供足够的血液来试验四个  $CD34^+CD38^- Lin^-$ 细胞剂量 (250、500、1000 和 2000 细胞/小鼠)。各个细胞剂量被提供给 5 个小鼠。对于这些设计假定，需要来自各个受试者的大约  $1.9 \times 10^4$  个  $CD34^+CD38^- Lin^-$ 细胞。如果进行另外的活体外群体形成研究，则将需要更多的细胞。

- 25 4. 各个正常的受试者将仅仅提供一次这些血样并且只有在周围血液中的  $CD34^+$ 细胞数达到  $15 \times 10^3 / ml$  时。 $CD34^+CD38^- Lin^-$ 群体占  $CD34^+$ 群体的 5-8% (Gallacher 等, Blood, 95: 2813-2820 (2000))。用正常志愿者的 TPO 进行的研究显示，在周围血液中观察到  $16 \times 10^3$  个  $CD34^+$ 细胞/ml。

5. 要求取自各受试者的 30 ml 血液产生  $2.25-3.6 \times 10^4$  个细胞。

6. 在安慰剂治疗的受试者中不可能进行这些研究，这是由于  $CD34^+$ 细胞的低水平 ( $< 3 \times 10^3 / ml$ )。为了进行比较，类似量的细胞取自用 G-CSF 治疗的受试者。将相同数量的细胞植入到小鼠中。

- 30 7. 用独立的数据检验这些假设的正确性。

在  $6 \times 10^6$  PBMCs 中大约有 1 个能够重新群居于 SCID / NOD 小鼠中 (Wang 等, Blood, 89: 3919 - 3924 (1997))。在这些群体中， $CD34^+$



群体为 0.13-0.39%并且 5-8%的该亚型为 CD34+CD38 - Lin -(Tichelli 等, Br. J. Hemato, 106: 152-158 (1999))。这表示 390 - 1872 细胞来自原始  $6 \times 10^6$  个 PBMCs。在 CD34+CD38 - Lin -群体中 SCID / NOD 重新群居的细胞发生的单独的研究中已经证明是 1 / 617 (Bhatia 等, PNAS, 94: 5320-5325 (1997))。这些数目与未经选择的细胞中的发生率的外推是一致的。

8. 如果细胞数量变得受限定, 则小鼠的最高细胞剂量群体将减少。

10 取自接受了 G-CSF 的志愿者的 CD34+细胞被用作这些研究的对照。

所建议的正常志愿者研究将提供按照剂量、服药方式以及服药时机以及能预测临床效力的强烈药代动力学证据而确定患者研究的设计方案所需的数据库。下一阶段的临床药理学计划是寻求再现计划进行干细胞移植的患者中所观察到的作用以及提供证明上面描述的药效终点与细则批准所需的临床终点之间的联系。然后将本发明的模拟化合物给药于需要给药的患者:

1. 来研究 TPO 模拟化合物在不同患者群体中的受益分布的危险, 其中的患者为用于自体同源干细胞移植的候选者; 和

2. 来获得 TPO 模拟化合物对外周血液 CD34+干细胞的脱落产量的可能影响以及植入后结果的初步证据。

第一患者研究同样为单一剂量、剂量递增的设计方案(假定没有理由以均分剂量形式提供 TPO 模拟化合物的剂量)。TPO 模拟化合物的剂量被导入标准的流动化药方中, 由志愿者研究预测在给药和收集之间的服药间隔。如同在上述的研究中一样, 在此研究中评价相同的药代动力学终点, 但是也获得了有关脱落产量、脱落的数量和随后的比率以及植入的时间的数据。通过单一使用含有冻干粉剂的 10-20 mg 管瓶进行给药, 如同在脱落之前以及在再输注收集的细胞之后以单一剂量通过静脉内施用丸剂。皮下定量给药的生物等价物可通过静脉内定量给药来施用。约 10-300  $\mu$ g/kg 之间的剂量是期望的。

本研究的关键是探索不同患者群体中 TPO 模拟化合物益处的风险性。越来越多的患者在其患病的初期接受高剂量的通过 ASCT 进行的

骨髓清除性化疗。这样的患者常常具有相对正常的骨髓，尤其是如果他们  
他们是青年人，可能会在必然进行的快速植入后使可接受量的 CD34+  
细胞流动。在这些群体中，其它增强流动作用的试剂的潜在影响可被  
限定但是可显示为用预定的串联移植的收集细胞进行的更加快速的植  
5 入。然而，这些群体，其非常类似于至少进行骨髓应答的正常群体，  
是开发 TPO 模拟化合物的重要的平移组群。

成为经历上述多种治疗过程后的 ASCT 候选者的患者通常在产生  
用于充分收集的足够的 CD34+细胞方面具有较大的困难。因此，许多  
这样的患者需要延长的脱落进度以及迟发型植入或失败植入的较高发  
10 生率。这些患者中的一部分不能经受自体同源移植并且必须采取具有  
增加的移植后并发症危险的异源移植。正是在这些群体中额外的流动  
化试剂可具有非常大的益处。

因此，第一患者研究将登记来自两个种类的患者。

来自“良好流动剂”的数据被用作基准来确定 TPO 模拟化合物对  
15 “弱流动剂”的影响。只接受标准护理的非治疗组被包括在内。

上述的药代动力学滴定终点提供了在 ASCT 中 TPO 模拟化合物的  
可能临床益处的强健的替代品。

确定的研究按照平行组、双盲、安慰剂对照研究进行。一旦出现  
随机化，关于移植的临床决定将按照预先确定的规则和公认的临床操  
20 作规程来作出。

该研究的初级终点为再输注收集的细胞后植入的平均时间。植入  
的时间被定义为持续 7 天没有进行输血支持直到血小板数维持在高于  
 $20 \times 10^9 / L$  的天数。

次级终点将包括：

- 25 1. 嗜中性粒细胞植入的时间（定义为维持在高于  $0.5 \times 10^9 / L$   
时的嗜中性粒细胞数）；
2. 血小板计数  $> 50 \times 10^9 / L$  的时间（在没有灌注支持的情况  
下维持 7 天的时间）；
3. 具有迟发型血小板植入的患者比例；
- 30 4. 具有继发性血小板植入失败的患者的比例；
5. 不能产生移植所需的最小收集量的患者的比例；
6. CD34+收集（CD34+细胞/kg）；

7. 收集所需的血浆清除疗法的数量；和
8. 血小板灌输的数量。

研究计划中的关键因素为目的群体的选择。

5 已公开的数据显示所收集的 CD34+的数量为随后的植入动力学的主要决定因素并且因此直接地影响研究的初级终点。影响使 CD34+流动的能力的主要的人口统计学特征为预处理的量和患者的年龄。大量的问题必须被考虑：

10 1. 如果选择弱流动化群体，则具有最大的机会来检测植入比率的改善，但是骨髓对 TPO 模拟化合物应答的能力可被损害到使得有可能无应答；

2. 如果选择高流动化群体，则检测对背景疗法应答的能力可能因下述事实而被限制：自我更新的 HSCs 的最佳数目将被再灌注而不考虑 TPO 模拟化合物的添加；

15 3. 本发明的 TPO 模拟化合物增加流动化的本质作用可能会阻止对良好的或差的流动剂的精确界定；

4. 检测对自我更新 HSCs 中增加的植入的影响的能力仅仅在其中这些细胞的数量为植入动力学的限制因素的患者中被观察到。

20 根据这些问题，重要的是用于这些研究的研究群体的数量在患者中被限制为流动作用范围的极端值处的患者数量。

在任一极端处也许难以证明化合物的效力。这些可通过排除可能高度有助于流动化的极端值的某些患者组（例如接受首行疗法的患者，患有脊髓发育不良和/或低骨髓储备的患者）以及通过确保样品大小被达到了预先确定的 CD34+收集大小范围的患者确定来实现（即不能满足这些标准的随机患者将被替换）。

25 如果遵守这种类型的设计方案，大多数安慰剂组的有助于初级终点的患者将具有按照 2 : 3 : 1 的比率分别落入下列类别中的 CD34+产量：

- 30 <  $2.0 \times 10^6$  / kg (植入的中值时间=17 天)  
2-5  $\times 10^6$  / kg (植入的中值时间=12 天)  
>  $5 \times 10^6$  / kg (植入的中值时间=10 天)。

在这些类型的群体中，植入的预期中值时间为 13-14 天。如果 TPO 模拟化合物对 CD34+产量的影响将不同收集类别的比例由 2:3:1 改变到 1:2:3，单独的这些改变将导致中值植入时间减少 1.66 天。如果由增加的自我更新 HSCs 量引起的各种类内的植入时间的增加，被叠加于该时间上，使得最低产量组中中值植入时间增加 5 天（即，它们表现得象中间产量组）以及在中间组中为 2 天（即它们表现得象高产量组），则中值植入时间的额外减少为 1.66 天。假定对于高产率组，对于植入时间无影响。总之，TPO 模拟化合物治疗对血小板中值植入时间的影  
5 响，用于计算样本大小的目的，将是 3 天。为了使得能通过最大机会来定义 TPO 模拟化合物的临床益处，应当设置允许成髓细胞消除所需的最小收集的相对低的阈值。

证明 TPO 模拟化合物在 ASCT 中的效力的能力是相对简单的，因为观测用单一剂量处理的正常志愿者的周围血液中 CD34+干细胞增加的数量就足够了。  
15

第一个人类研究将因此证明生物学上的相关作用。一些研究确定了周围血液中 CD34+细胞水平是随后的脱落产率的重要预示因子。然而，对于干细胞流动作用与 G-CSF 联合的影响在第一个患者研究完成前不会被建立。建立流动化的 CD34+细胞含有增加量的干细胞将是更加困难的，在某种程度上是因为难以测定在未受刺激的患者中 HSCs 的水平低。然而，由于据报道 G-CSF 不影响 CD34+群体中 HSCs 的比例，通过与用 G-CSF 流动化的细胞相比，可以推断 TPO 模拟化合物对流动细胞群体中自我更新的 HSCs 数量的某种影响。  
20

最重要的成功的预示因子是脱落的产量。再灌注细胞的数量是随后的植入时间的重要的预示因子。因此，具有临床上可接受的或高产率的患者比例是可能对植入时间以及迟发型或植入失败患者比例发生影响的主要决定因素。  
25

人们期望 TPO 模拟化合物在使干细胞流动方面与 G-CSF 同样好或优于 G-CSF 以及 TPO 模拟化合物提供改进的流动干细胞群体的性能。

当将自体同源干细胞移植添加于预定进行骨髓清除性化疗的患者的标准流动化方案中时，单盲研究评价 TPO 模拟化合物对周围血液 CD34+干细胞的流动化的影响。  
30

为了测定在脱落之前，TPO 模拟化合物对干细胞流动化的影响，将进行证明使正常志愿者中的 CD34+细胞流动的剂量的单一剂量、剂量递增的研究。各剂量群体将含有六个接受活性药物治疗的患者和两个仅仅接受 G-CSF 背景疗法的患者。各群体被分成各包括 3 个活性的患者和 1 个安慰剂患者的两个组。一个组为接受自体同源 SCT 如首行疗法的患者，而另一个组为接受自体同源 SCT 如抢救疗法的严重预处理的患者。当剂量达到相对于安慰剂患者和用于测定 G-对干细胞的流动化的影响的历史对照产生增加的 CD34+细胞产量（作用大小将定义）时，补充八个额外的该剂量下的患者（每一亚群体），其中该剂量巩固效力的证据以及探索另外的前和后移植终点（包括产生  $3 \times 10^6$  个细胞/kg 所需的脱落的数量，达到充分收集的患者的比例以及移植后嗜中性粒细胞恢复的时间和血小板输血的独立性）。

此外将继续按照最初的随机化时间表来增加剂量。如果一个亚群体达到效力平稳状态或限制毒性的剂量，则剩余的亚群体将继续增加剂量。在脱落的时候，获得脱落的细胞样品用于所收集的细胞的分化能力的研究（假定收集的大小不限定）。在满足筛选标准和收集基准血样之后，患者将接受通过 60 分钟内静脉内输注的单一剂量的研究药物治疗。每 48 小时进行一次探访直到干细胞被完全地收集。如果 10 个脱落不能产生成功植入所需的足够的细胞（最小  $2 \times 10^6$ /kg），则认为干细胞收集是失败的。然后按照所规定的用于患者肿瘤的规程对患者继续进行骨髓清除性化疗、干细胞再输注和其后合适的支持护理。按照预先确定的说明由源文档提取植入的数据。

在每次研究性访问时提取样品，用于各种药物代谢动力学的抽样研究。

利用 ELISA 测定化合物的水平。

相信按照本发明的方法施用 TPO 模拟化合物具有许多优点，尤其包括：

- 当用于标准疗法时减少 3 天的血小板中值植入时间（定义为血小板数  $> 20 \times 10^9$ /L）。当使用非标准疗法时减少 1 天。
- 将具有血小板植入延迟时间的患者的比例由 40%减少到 10%。
- 将达到初级血小板恢复的患者（定义为维持血小板数  $>$

50,000 达 7 天时间的患者)的比例由 60%增加到 85%。

- 减少血小板灌输所需的量(由中值 5 减少到中值 3)。
- 减少  $ANC > 0.5 \times 10^9/L$  的中值时间为 1 天到。
- 当与 G-CSF 组合使用时,未能满足用于移植的最小干细胞收集 ( $3 \times 10^6/kg$ ) 的患者的比例减少(由 35%到 5%)。
- 当与 G-CSF 组合使用时, CD34+细胞的产量 ( $4 \times 10^6/kg$  对  $1 \times 10^6/kg$ ) 增加。
- 当与 G-CSF 组合使用时,产生足够的细胞来支持移植所需的收集的量减少(由中值 3 到中值 1)。

10

适当的单剂量疗法增加干细胞移植的效率,允许对固体肿瘤、骨髓瘤淋巴瘤进行更具攻击力的治疗以及增加用于干细胞移植的候选者的数量。

- 15 尽管在上面仅仅具体描述了本发明的特定实施方案被,但是可以理解对本发明进行不违背本发明的精神和范围本发明的修饰和变化是可能的。

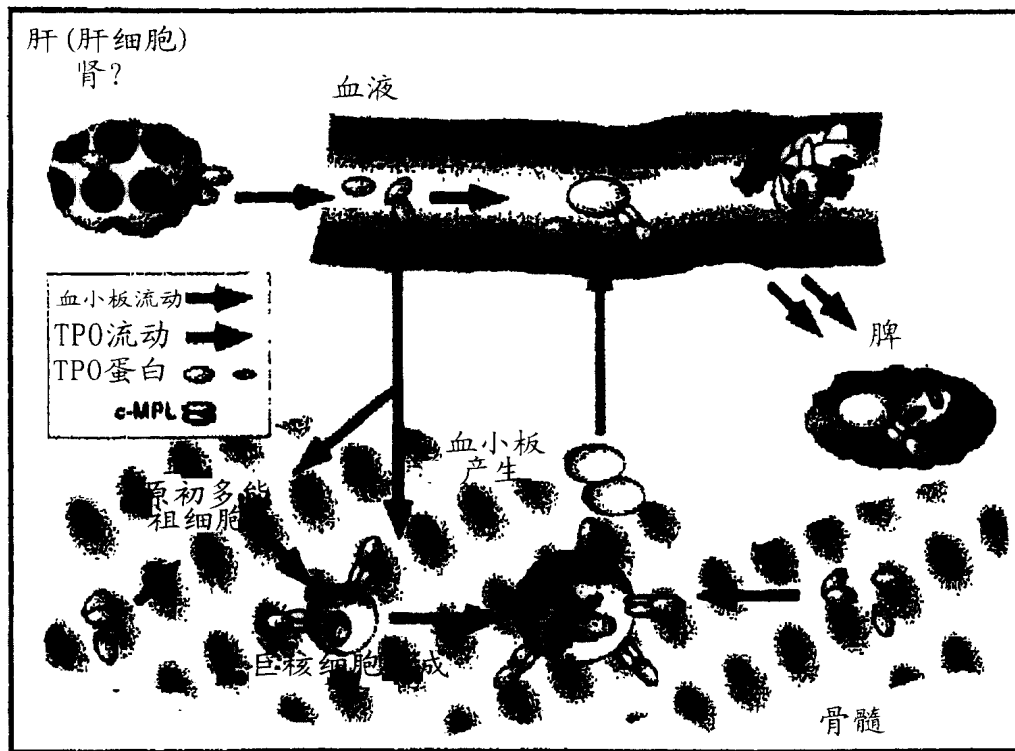


图 1

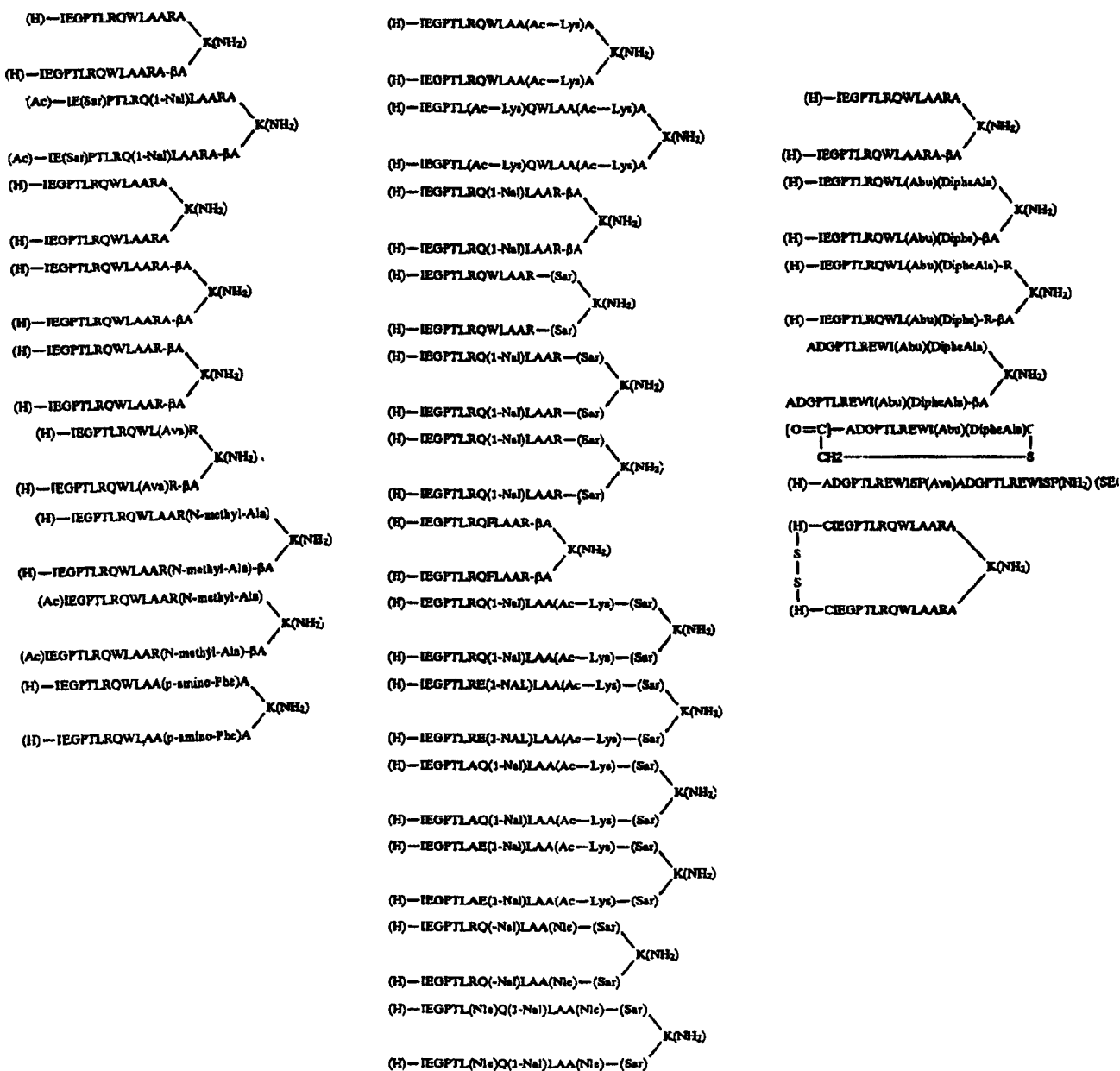


图 2